

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 686 605**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **92 00806**

(51) Int Cl⁵ : C 07 K 13/00, C 12 N 15/12, 15/63, C 12 P 21/02,
A 61 K 37/02

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 27.01.92.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —
FR.

(72) Inventeur(s) : Deneffe Patrice, Guinet Françoise, Latta
Martine et Murry-Breliev Anne.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 30.07.93 Bulletin 93/30.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire :

(54) **Nouveaux polypeptides, leur préparation et leur utilisation.**

(57) La présente invention concerne des polypeptides dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine (apoAII), les séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides, leur préparation et leur utilisation.

FR 2 686 605 - A1



NOUVEAUX POLYPEPTIDES, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION

La présente invention concerne des polypeptides dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine (apoAI), les séquences nucléotidiques codant pour ces polypeptides, leur préparation et leur utilisation.

L'apolipoprotéine AIV (apoAIV) est une protéine constituée de 376 acides aminés, ayant une masse moléculaire de 46 000 daltons. La figure 1 met en évidence les séquences peptidiques et nucléotidiques de l'apoAIV, ainsi que la position des hélices. L'apoAIV est un composant majeur des chylomicrons sécrétés dans la lymphe, mais elle présente la particularité d'être majoritairement sous forme non associée avec des lipoprotéines dans le plasma (R.B. Weinberg et Coll., 1983, J. Lipid. Research, 24 : 52-59). Par ailleurs, l'apoAIV plasmatique est polymorphe, bien que la nature de ce polymorphisme soit encore inconnue (G. Utermann et Coll., 1982, J. Biol. Chem. 257 : 501-507). Le rôle physiologique de l'apoAIV demeure également assez peu connu. On sait qu'elle peut activer in vitro la lécithin-cholestérol-acyltransférase (LCAT) (Steinmetz et Coll., 1985, J. Biol. Chem., 260 : 2258-2264) et qu'elle peut, comme l'apolipoprotéine AI, interférer avec la fixation des particules de HDL sur les cellules endothéliales aortiques bovines (Savion et Coll., 1987, Eur. J. Biochem., 257 : 4171-4178). Ces deux activités semblent indiquer que l'apoAIV intervient très vraisemblablement comme médiateur du transport inverse du cholestérol.

La présente invention résulte du choix de la demanderesse d'utiliser l'apolipoprotéine AIV comme molécule cible pour l'étude des facteurs influençant le transport inverse du cholestérol. La présente invention repose plus précisément sur l'utilisation de l'apoAIV pour la préparation de produits nouveaux, permettant, par de nouvelles thérapies, de lutter contre les hypercholestérolémies et les effets qui y sont associés, tels que l'athérosclérose.

Plus précisément, la présente invention fournit des polypeptides dérivés de l'apoAIV, et permet ainsi d'exploiter pharmacologiquement les propriétés de cette protéine. La présente invention a donc pour objet des polypeptides dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine. Il peut s'agir en particulier de polypeptides ayant une stabilité plasmatique accrue par rapport à la protéine native (sensibilité plus faible aux mécanismes physiologiques d'élimination ou de dégradation), et par conséquent

une durée de vie plus longue. Il peut également s'agir de polypeptides ayant une activité stimulatrice de l'efflux du cholestérol cellulaire, et donc favorisant le transport inverse du cholestérol, conduisant à décharger les cellules ayant accumulé du cholestérol dans le contexte de la formation d'une plaque d'athérome. Il peut également s'agir de polypeptides possédant seulement une ou plusieurs des propriétés de l'apoAIV. En particulier, il peut s'agir par exemple de polypeptides capables de lier les récepteurs cellulaires, mais ne possédant pas l'activité stimulatrice de l'efflux du cholestérol cellulaire. En outre, il peut également s'agir de polypeptides dépourvus des activités de l'apoAIV. De tels polypeptides peuvent en effet présenter des utilités thérapeutiques (génération d'anticorps, études structure-fonction, etc).

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention sont capables de lier le récepteur HDL.

Encore plus préférentiellement, les polypeptides sont capables de lier le récepteur HDL et de stimuler un efflux de cholestérol.

Les polypeptides selon l'invention peuvent être de plusieurs types. Il peut s'agir, par rapport à l'apoAIV humaine, de dérivés de mutation ou de substitution, de dérivés de délétion ou de dérivés d'addition. Il est entendu que la présente invention couvre également les polypeptides comportant plusieurs types de modifications, tels que par exemple des dérivés de mutation et de délétion, des dérivés de délétion et d'addition, etc.

Plus préférentiellement, l'invention a pour objet des polypeptides non-naturels dérivés de l'apolipoprotéine AIV humaine comprenant, par rapport à la séquence de l'apolipoprotéine AIV humaine telle que représentée sur la figure 1, au moins une des modifications suivantes :

- (a) une mutation ponctuelle portant sur un résidu fonctionnel, et/ou,
- (b) une délétion d'une extrémité terminale d'au moins 10 acides aminés, et/ou,
- (c) une délétion d'une hélice ou d'une paire d'hélices, et/ou,
- (d) une partie additionnelle hétérologue possédant une activité biologique différente ou complémentaire de celle de l'apoAIV, ou une propriété de marqueur, de cibleur ou de stabilisateur.

Dans un mode particulier, les polypeptides de l'invention comprennent au moins une modification selon (a) et (b).

Dans un autre mode particulier, les polypeptides de l'invention comprennent au moins une modification selon (a) et (c).

Dans un autre mode particulier, les polypeptides de l'invention comprennent une modification selon (a), (b) ou (c) associée à une modification selon (d).

Les dérivés de mutation comprennent généralement une mutation ponctuelle (suppression d'un acide aminé, ou modification d'un acide aminé, ou remplacement d'un acide aminé par un autre), ou double (modification d'une paire d'acides aminés). Les mutations choisies tiennent compte de la position des résidus mutés dans leurs hélices respectives, et tendent a priori à modifier les groupements fonctionnels sans trop perturber la structure de l'hélice concernée, et donc du polypeptide. Au sens de la présente invention, on entend par résidu fonctionnel les résidus susceptibles d'être impliqués dans l'activité de l'apoAIV, soit au niveau de l'interaction avec le récepteur, soit au niveau de la transmission d'un signal (tel que par exemple la stimulation de l'efflux du cholestérol). Les résidus préférés sont généralement les résidus chargés, qui possèdent un effet potentiel dans l'interaction du polypeptide avec son récepteur. De tels résidus peuvent être remplacés par d'autres, apolaires, ou modifiés chimiquement par suppression ou ajout d'une charge. Les résidus glycosylés et les résidus impliqués dans la formation de ponts disulfure (cystéine) constituent d'autres résidus préférés.

Préférentiellement, les polypeptides de l'invention possèdent par rapport à l'apoAIV humaine telle que représentée sur la figure 1 au moins une mutation sur l'un des résidus suivants : acide aspartique en position 5, 44, 106, 153 ; glutamine en position 37, 194 ; asparagine en position 39 ; lysine en position 73, 84, 103, 169, 178 ; acide glutamique en position 76, 81, 87, 99, 131, 164, 187, 230 ; alanine en position 22 ; proline en position 139, 161 ; et serine en position 154.

Plus préférentiellement, l'acide aspartique peut être remplacé par un résidu S, K, A, F ou G ; la glutamine par un résidu T, K ou F ; l'asparagine par un résidu A ou D ; la lysine par un résidu G, E, T, D, A, Y, H ou F ; l'acide glutamique par un résidu S, R, F, K, A, G, N, ou Q ; l'alanine par un résidu R ou E ; la proline par un résidu R ou G ; et la sérine par un résidu E ou R (les lettres correspondent à un acide aminé selon le code reconnu).

Les polypeptides de l'invention peuvent être des dérivés de délétion. Dans ce cas, la ou les délétions peuvent porter sur une extrémité de la protéine (C-terminale ou N-terminale). A cet égard, certains polypeptides de l'invention sont des fragments d'apoAIV, obtenus par délétion de parties importantes de la protéine. Préférentiellement, les polypeptides de l'invention possèdent par rapport à l'apoAIV

humaine des délétions terminales d'au moins 10 acides aminés. La ou les délétions peuvent également porter sur des régions internes de l'apoAIV, et notamment sur des hélices entières ou sur des paires d'hélices.

Un autre type de polypeptides selon l'invention est représenté par des dérivés d'addition. En particulier, l'invention concerne les polypeptides comprenant tout ou partie de l'apoAIV et un élément supplémentaire tel qu'un marqueur, un cibleur, un stabilisant ou un autre élément actif.

A titre d'exemples spécifiques de polypeptides selon l'invention, on peut citer préférentiellement les polypeptides suivants :

- 10 - polypeptide P(Δ N13,R93G) : polypeptide possédant une délétion des 13 acides aminés N-terminaux (Δ N13) et une glycine au lieu d'une arginine en position 93 (R93G).
- polypeptide P(Δ N13) : polypeptide possédant une délétion des 13 acides aminés N-terminaux.
- 15 - polypeptide P(R93G) : polypeptide possédant une glycine au lieu d'une arginine en position 93.
- polypeptide P(Δ C44) : polypeptide possédant une délétion des 44 acides aminés C-terminaux.
- polypeptide P(Δ C194) : polypeptide possédant une délétion des 194
20 derniers acides aminés.
- polypeptide P(Δ N182) : polypeptide possédant une délétion des 182 premiers acides aminés.
- polypeptide P(Δ h1-2) : polypeptide possédant une délétion des hélices 1 et 2 telles que représentées sur la figure 1 (résidus D14 à V62).
- 25 - polypeptide P(Δ h7-8) : polypeptide possédant une délétion des hélices 7 et 8 telles que représentées sur la figure 1 (résidus P162 à A205).
- polypeptide P(Δ h9-10) : polypeptide possédant une délétion des hélices 9 et 10 telles que représentées sur la figure 1 (résidus P206 à A249).
- polypeptide P(Δ h11-12) : polypeptide possédant une délétion des hélices
30 11 et 12 telles que représentées sur la figure 1 (résidus P250 à E289).
- polypeptide P(Δ h11-12,L87M) : polypeptide possédant une délétion des hélices 11 et 12 telles que représentées sur la figure 1 (Δ h11-12), et une methionine au lieu d'une leucine en position 87 (L87M).

- polypeptide P(Δ h13-14) : polypeptide possédant une délétion des hélices 13 et 14 telles que représentées sur la figure 1 (résidus P290 à N333).
- polypeptide P(Δ h5-6) : polypeptide possédant une délétion des hélices 5 et 6 telles que représentées sur la figure 1 (résidus P118 à R161).
- 5 - polypeptide P(D44F) : polypeptide possédant une phénylalanine au lieu d'un acide aspartique en position 44.
- polypeptide P(D44A) : polypeptide possédant une alanine au lieu d'un acide aspartique en position 44.
- polypeptide P(D5S) : polypeptide possédant une sérine au lieu d'un acide
10 aspartique en position 5.
- polypeptide P(D5K) : polypeptide possédant une lysine au lieu d'un acide aspartique en position 5.
- polypeptide P(K178Y) : polypeptide possédant une tyrosine au lieu d'une lysine en position 178.
- 15 - polypeptide P(K178A) : polypeptide possédant une alanine au lieu d'une lysine en position 178.
- polypeptide P(E230K) : polypeptide possédant une lysine au lieu d'un acide glutamique en position 230.

De tels polypeptides selon l'invention présentent un intérêt pharmaceutique
20 important, notamment dans le traitement et/ou la prévention de l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie qui se caractérise par la formation de plaques lipidiques ou fibro-lipidiques dans l'intima de l'aorte, des artères coronaires et de la carotide essentiellement. Ces plaques, plus ou moins calcifiées selon l'avancement du processus, peuvent être jumelées à des lésions, et sont créées par l'accumulation dans
25 les artères de dépôts graisseux constitués essentiellement d'esters de cholestérol. Ces plaques provoquent alors un épaississement de la paroi artérielle, avec hypertrophie du muscle lisse, apparition de cellules spumeuses et accumulation de tissu fibreux. La plaque athéromateuse est très nettement en relief sur la paroi, ce qui lui confère un caractère sténosant responsable des occlusions vasculaires par athérome,
30 thrombose ou embolie, qui surviennent chez les patients les plus atteints.

La formation d'une plaque d'athérome résulte donc de la conjugaison de différents facteurs, (i) un excès de cholestérol plasmatique, dont proviennent les dépôts artériels, et (ii) un défaut de régulation entre influx et efflux de cholestérol au niveau des tissus périphériques, en faveur d'une accumulation intracellulaire.

Compte tenu de leur propriétés, les polypeptides selon l'invention peuvent notamment permettre de ralentir la formation des plaques d'athérome, d'induire la régression des plaques d'athérome, et de diminuer le risque d'incidence d'accidents coronariens.

5 Les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus de différentes façons, et notamment par voie chimique et/ou génétique.

Dans le cas de la préparation par voie chimique, les polypeptides de l'invention peuvent être obtenus soit entièrement par synthèse chimique, soit par modifications chimique ou enzymatique de la protéine native. Dans ce dernier cas, différents agents chimiques ou enzymatiques peuvent être utilisés, permettant de modifier des résidus (dérivés de mutation), de marquer des résidus (dérivés d'addition) ou de fragmenter la protéine (dérivés de délétion). Parmi les agents chimiques permettant de modifier ou marquer des acides aminés, on peut citer plus particulièrement le sulfo-NHS-acétate, qui permet l'acylation des amines primaires et surtout des lysine ; le tétranitrométhane qui introduit un groupement nitrate sur les tyrosines, ou encore le N-bromo-succinimide qui oxyde les résidus tryptophane. Parmi les agents chimiques et enzymatiques permettant de couper des liaisons peptidiques, on peut citer plus particulièrement le bromure de cyanogène, le iodosobenzoate, la trypsine, la chymotrypsine, la thermolysine ou encore la proendopeptidase.

Comme indiqué plus haut, ces traitements peuvent être appliqués aussi bien sur le polypeptide produit d'une synthèse chimique que sur le polypeptide natif. De plus, ces traitements peuvent également être appliqués aux polypeptides obtenus par voies génétique, et de ce fait, comportant déjà certaines modifications.

25 Dans le cas de la préparation par voie génétique, les polypeptides de l'invention sont obtenus par modification au niveau des séquences nucléotidiques codantes, et expression desdites séquences dans un hôte cellulaire.

A cet égard, la présente invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides décrits plus haut. Il peut s'agir de séquences d'ADN, de séquences d'ARN, de séquences synthétiques, semi-synthétiques, hybrides, etc. Ces séquences peuvent être utilisées :

30 - pour la production des polypeptides de l'invention par expression dans un hôte cellulaire,

- comme composition pour des thérapies géniques,
- pour la réalisation de sondes marquées permettant l'identification de polypeptides apparentés ou la mise en évidence d'une expression des polypeptides de l'invention,

5 - pour la préparation de nouveaux vecteurs de clonage ou d'expression comportant ces séquences, ou encore,

- pour la préparation de nouvelles cellules eucaryotes ou procaryotes recombinantes ou d'animaux transgéniques contenant ces séquences ou ces vecteurs.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être obtenues à partir
10 d'une séquence codant pour l'apoAIV, par différentes techniques telles que notamment par découpage génétique, mutagenèse, ou tout autre traitement altérant la structure des acides nucléiques. Les techniques les plus connues de l'homme du métier sont mentionnées ci-après dans les techniques générales de clonage. Le détail de la synthèse des séquences nucléotidiques de l'invention est donné dans la partie B/
15 des exemples. La séquence de l'apoAIV humaine utilisée dans l'invention a été obtenue à partir d'un clone génomique contenant le fragment KpnI-HindIII de la séquence du gène humain de l'apoAIV, qui contient la fin de l'intron 2, la totalité de l'exon 3 ainsi que la séquence 3' non traduite. Ce clone ne contenait donc pas, en particulier, les deux premiers exons du gène de l'apoAIV humaine (Elshourbagy et
20 coll. J.B.C. (1987) 262:7973). La séquence complète a été obtenue par :

- synthèse chimique de l'extrémité 5' de la séquence de l'apoAIV, de sorte que ce fragment synthétique contienne les codons correspondant à la partie de la protéine mature codée par les deux premiers exons du gène humain, et également les premiers nucléotides de la région 5' de l'exon 3 s'étendant jusqu'au site BstEII ; puis,

25 - la liaison de ce fragment synthétique à un fragment d'ADN contenant le restant de la séquence du gène de l'apolipoprotéine AIV située après le site BstEII, utilisé pour effectuer la jonction au nucléotide près.

Le détail de ces étapes est donné dans la partie A/ des exemples.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des
30 polypeptides de l'invention décrits plus haut. Ce procédé consiste à réaliser les étapes suivantes :

- dans une première étape, on introduit dans une cellule une séquence nucléotidique telle que définie plus haut codant pour un polypeptide de l'invention,

35 - dans une deuxième étape, on cultive la cellule ainsi obtenue dans des conditions d'expression de ladite séquence nucléotidique et,

- dans une troisième étape, on récupère le polypeptide produit.

Plus particulièrement, lors de la première étape du procédé de l'invention, la séquence nucléotidique peut être introduite dans la cellule par différentes techniques. Notamment, l'introduction peut être effectuée par transformation, conjugaison, ou électroporation.

S'agissant de la transformation, différents protocoles ont été décrits dans l'art antérieur. En particulier, elle peut être réalisée en traitant les cellules entières en présence d'acétate de lithium et de polyéthylène glycol selon la technique décrite par Ito et al. (J. Bacteriol. 153 (1983) 163-168), ou en présence d'éthylène glycol et de diméthylsulfoxyde selon la technique de Durrens et al. (Curr. Genet. 18 (1990) 7). La transformation peut encore être effectuée selon la technique décrite par Dagert et al. (Gene 6 (1979) 23-28) par traitement avec une solution de CaCl₂ puis choc thermique. Un protocole alternatif a également été décrit dans la demande de brevet EP 361 991.

S'agissant d'électroporation, la technique décrite par Karube et al. (FEBS Letters 182 (1985) 90) peut avantageusement être utilisée.

Le choix de l'une ou de l'autre de ces méthodes est établi notamment en fonction de l'hôte choisi.

Parmi les hôtes eucaryotes utilisables dans le procédé de l'invention, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia pastoris, Schwanniomyces, ou Hansenula. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, C127, etc. Parmi les champignons susceptibles d'être utilisés dans la présente invention, on peut citer plus particulièrement Aspergillus ssp. ou Trichoderma ssp.

Parmi les hôtes procaryotes utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer les bactéries suivantes E.coli, Bacillus, ou Streptomyces.

Dans un mode préféré de l'invention, le procédé est mis en oeuvre en utilisant comme cellule hôte une cellule procaryote.

Encore plus préférentiellement, le procédé de l'invention est mis en oeuvre en utilisant comme cellule hôte la bactérie E.coli.

Généralement, la séquence nucléotidique utilisée est une séquence génomique, une séquence d'ADNc, une séquence séquence hybride, etc. Pour une meilleure mise en oeuvre de l'invention, on préfère cependant utiliser un ADNc (Cf

exemple A/). Par ailleurs, cette séquence nucléotidique comprend généralement une région de démarrage de la transcription et de la traduction jointe à l'extrémité 5' terminale de la séquence codante, de façon à diriger et à réguler la transcription et la traduction de ladite séquence. Le choix de ces régions peut varier en fonction de l'hôte utilisé. En particulier, chez les bactéries telles que E.coli, on peut utiliser le promoteur de l'opéron tryptophane (Ptrp), ou les promoteurs gauche et droit du bactériophage lambda (PL, PR) ou encore le promoteur du gène 10 du bactériophage T7.

Par ailleurs, la séquence nucléotidique fait préférentiellement partie d'un vecteur, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. A titre d'exemple, chez la levure, il peut s'agir d'origines de répllication dérivées de plasmides : pKD1 (EP 241 435) ou bien de séquences chromosomiques (ARS) et chez la bactérie, il peut s'agir d'origines de répllication dérivées de plasmides (pBR322, pET3, etc). S'agissant des vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés par exemple en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur. A cet égard, l'utilisation d'ADNr permet une intégration multiple de l'ADN exogène, et donc sa présence en plus grand nombre de copies par cellules.

Dans un mode préféré, la séquence nucléotidique comprend, en amont de la séquence codante, ou, le cas échéant, entre la région de démarrage de la transcription et de la traduction et la séquence codante, une séquence "leader" dirigeant le polypeptide naissant dans les voies de sécrétion de l'hôte utilisé. Cette séquence "leader" peut être la séquence "leader" de l'apoAIV, mais il peut également s'agir d'une séquence hétérologue (issue d'un gène codant pour une autre protéine) ou même artificielle. Le choix de l'une de ces séquences est notamment guidé par l'hôte utilisé.

Les polypeptides de la présente invention peuvent ensuite être isolés du milieu de culture par toute technique connue de l'homme du métier. Plus particulièrement, la partie C/ des exemples décrit un procédé permettant de purifier dans les conditions natives, c'est-à-dire sans aucune étape de dénaturation, les polypeptides de l'invention.

Un autre objet de l'invention concerne des compositions pharmaceutiques comportant un ou plusieurs polypeptides selon l'invention ou une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention.

Préférentiellement, de telles compositions sont destinées au traitement ou à la prévention des affections liées aux hypercholestérolémies.

Encore plus préférentiellement, l'invention a pour objet des compositions pharmaceutiques comportant un ou plusieurs polypeptides selon l'invention, ou une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'invention, destinées au ralentissement de la formation de plaques d'athérome, et/ou à la régression des plaques d'athérome et/ou à la diminution des risques d'accidents coronariens.

De plus, la présente invention a également pour objet l'utilisation des polypeptides décrits ci-avant pour la réalisation de molécules de structure non-peptidique ou non exclusivement peptidique possédant le même type d'activité. A cet égard, l'invention concerne un procédé de préparation de molécules non-peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement sur les niveaux plasmatiques de cholestérol, selon lequel on choisit un polypeptide de l'invention tel que décrit ci-avant, on détermine les éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité, et on reproduit ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules obtenues selon ce procédé.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples suivants, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

- Figure 1 : Séquences peptidique et nucléotidique de l'apoAIV.
Figure 2 : Séquence des oligonucléotides utilisés pour préparer la séquence de l'apoAIV.
Figure 3 : Structure et construction du plasmide pXL1697.
Figure 4 : Structure des plasmides pXL1872 et pXL1867.
Figure 5 : Structure des plasmides pXL1696 et pXL2051.

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE

Les techniques classiques de purification de plasmides, de préparation des cellules compétentes pour la transformation par la méthode au CaCl_2 , sont décrites dans le manuel de laboratoire : T. Maniatis et Coll., Molecular cloning, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory. Les séquences d'ADN ont été déterminées par la méthode de Sanger (Smith A.J.H., 1980, Methods in Enzymol. 65 : 499-559). Les protocoles de clonage dans M13 sont décrits (Messing et Coll. 1981, Nucleic Acid Res. 9 : 309-321). Les endonucléases de restriction (New England Biolabs) ont été utilisées selon les conseils du fabricant. Le tampon utilisé pour les ligatures a la composition suivante : Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 15 mM, ATP 1 mM, pH 7,5. Le tampon de phosphorylation des oligonucléotides a la composition suivante : Tris-HCl 5 mM, MgCl_2 1 mM, DTT 0,6 mM, pH 7,5. La mutagénèse dirigée in vitro par oligodésoxynucléotides est effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. (Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764) en utilisant le kit distribué par Amersham.

A - SYNTHÈSE ET ASSEMBLAGE DE LA SÉQUENCE CODANTE DE L'APOLIPOPROTEINE AIV ET PRÉPARATION DES VECTEURS.

A1 - Synthèse et assemblage de la séquence codante de l'ApoAIV.

La séquence nucléotidique du gène de l'apolipoprotéine AIV décrite dans la présente invention diffère des séquences de cDNA publiées précédemment (voir en particulier la liste des séquences cDNA publiée par C-Y. Yang, Z-W. Gu, I. Chong, W. Xiong, M. Rosseneue, H. Yang, B. Lee, A.M. Gotto et L. Chan, 1989, B.B.A., 1002 : 231-237). Notamment, la séquence codant pour le peptide signal de la protéine est absente, et, en amont du premier codon de la protéine mature a été placé un codon de démarrage de la traduction ATG. Celui-ci introduit donc une méthionine surnuméraire en amont de la séquence de la protéine mature, et permet ainsi d'exprimer le gène codant uniquement pour la partie mature de la protéine.

D'autre part, cette séquence nucléotidique de l'apolipoprotéine AIV a été obtenue d'une manière originale par l'assemblage de quatre oligonucléotides, représentés sur la figure 2, qui ont été synthétisés par voie chimique et dont la taille est comprise entre 86 et 107 mer. De plus, on peut remarquer sur la figure 2 que des extrémités cohésives XbaI et EcoRI ont été définies afin de permettre un assemblage en deux étapes de la séquence complète de l'apolipoprotéine AIV.

1. Synthèse des oligonucléotides

Les quatre oligodéoxynucléotides qui ont servi à l'assemblage du gène de l'apolipoprotéine AIV, ont été synthétisés par la méthode des phosphoramidites (L.J. Bride et M.H. Caruthers (1983) Tetrahedron Lett. 24 : 245) au moyen du synthétiseur Biosearch (Modèle 8600) selon les conseils des fabricants. Les oligonucléotides ont été purifiés sur gel d'acrylamide 15 %. Leur séquence est donnée à la figure 2.

2. Première étape d'assemblage

Les oligonucléotides ont été phosphorylés par traitement avec la T4 DNA kinase. Les oligonucléotides A et C ont été appariés respectivement avec les oligonucléotides B et D dans des conditions stoechiométriques. L'hybridation des oligonucléotides a été réalisée dans des tubes Eppendorf immergés dans un bécher contenant environ 100 ml d'eau portée à 80°C que l'on laisse revenir à la température du laboratoire.

Les fragments A-B et C-D ont été ligaturés en présence de T4 DNA ligase avec la forme répllicative du phage M13mp10 au préalable digérée par les enzymes XbaI et EcoRI.

La forme répllicative du bactériophage recombinant obtenu appelé pXL1695 (M13mp10ABCD) a servi à transfecter des bactéries TG1 rendues compétentes par la méthode au CaCl_2 .

Ce réplicon pXL1695 a été purifié, soit sous sa forme d'ADN simple brin et sa séquence a été vérifiée, soit sous sa forme d'ADN double brin répllicative pour la suite des constructions.

3. Deuxième étape d'assemblage

La forme répllicative de pXL1695 (M13mp10ABCD) et un plasmide appelé pXL1694 portant un fragment KnpI-HindIII d'environ 3 kb contenant la totalité du troisième exon du gène de l'apoAIV (N.A. Elhourbagy, J. Biol. Chem., 1987, 262 : 7973-7981) ont été respectivement digérés par XbaI et BstEII d'une part et EcoRI et BstEII d'autre part. Dans le cas de pXL1695, un fragment de 167 paires de bases a été purifié sur gel d'acrylamide. La forme répllicative du vecteur M13mp18amIV a été digérée par XbaI et EcoRI et un fragment d'environ 7 kb a été purifié sur gel d'agarose.

Les trois fragments ont été rassemblés et ligaturés en présence de T4 DNA ligase.

Après transfection de TG1, des clones contenant la forme répliquative appelée pXL1696 ont été obtenus. La séquence codante complète du fragment XbaI-EcoRI ainsi cloné dans pXL1696 a été vérifiée. Ce fragment a ensuite été re-extrait de pXL1696 et ligaturé en présence d'un fragment EcoRI-HindIII, d'environ 3 kb provenant de pXL1694 et portant en particulier la fin de l'exon 3 du gène de l'apoAIV humaine, et en présence également du vecteur M13mp19, coupé par les enzymes XbaI et HindIII.

Le vecteur recombinant ainsi obtenu, pXL1697, porte la totalité de la séquence codante de l'apoAIV (1132 bp) ainsi qu'un fragment génomique d'environ 2 kb correspondant à l'intron 3 du gène de l'apoAIV (figure 3).

Une mutagénèse dirigée effectuée avec le kit de mutagénèse Amersham (RPN 1523) à l'aide de l'oligodeoxynucléotide synthétique Sq1087 : 5'-GCCCCTTTGGAGAGCTGAGGATCCCCTGGTGCCTGGCCCCA-3' a permis d'introduire sur pXL1697 un site BamHI immédiatement après le codon Stop (TGA) du gène de l'apoAIV. Le vecteur obtenu a été dénommé pXL1866.

A2 - Préparation des vecteurs portant la séquence de l'apoAIV.

1. Préparation du vecteur pXL1872.

Le vecteur pXL1866 décrit ci-dessus a été coupé par les enzymes XbaI et BamHI, et un fragment de 1,15 kb contenant la totalité de la séquence codante de l'apoAIV a été purifié sur gel d'agarose et religaturé dans M13mp18amIV pour donner le vecteur pXL1872 (figure 4).

2. Préparation du vecteur pXL1867.

Le vecteur pXL1866 a été coupé par NdeI et BamHI et un fragment de 1,2 kb a été purifié puis inséré dans pET3-a, lui-même coupé par BamHI et NdeI. Le vecteur d'expression résultant, pXL1867, contient donc la séquence codante de l'apolipoprotéine AIV sans aucun fragment résiduel de l'intron 3 provenant de la séquence génomique de l'apolipoprotéine AIV (figure 4).

3. Préparation du vecteur pXL1696.

Le fragment XbaI-EcoRI de 570 pb contenant la partie 5' de la séquence codante de l'apoAIV (résidus 1 à 189) a été excisé du vecteur pXL1872, purifié sur gel d'agarose et religaturé dans M13mp10 pour donner le vecteur pXL1696 (figure 5).

4. Préparation du vecteur pXL2051.

Le fragment EcoRI-BamHI de 577 pb contenant la partie 3' de la séquence codante de l'apoAIV (résidus 188 à 377) a été excisé du vecteur pXL1872, purifié sur gel d'agarose et religaturé dans M13mp19 pour donner le vecteur pXL2051 (figure 5).

B - GENERATION DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR LES POLYPEPTIDES DE L'INVENTION ET PRODUCTION DE CES POLYPEPTIDES.

B1 : Mutants réalisés à partir du vecteur pXL1872

1. Génération des vecteurs pXL1775 et pXL1869, et préparation des polypeptides P(Δ N13,R93G) et P(Δ N13).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant : 5'-GACCAGGTGGCCACAGTGCATATGGACTACTTCAGCCAGCTG-3', une mutagenèse dirigée sur la forme simple brin du vecteur pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagenèse a permis d'introduire un site NdeI ainsi qu'un codon ATG dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 40 et 43, provoquant une délétion des 13 premiers acides aminés N-terminaux. Par ailleurs, lors de la vérification de séquence des dérivés obtenus, certains clones dont le clone pXL1799 portaient une mutation ponctuelle supplémentaire en position 280 sur la séquence. Cette mutation (C->G) a pour effet de changer un codon arginine en glycine dans la protéine.

A partir du clone pXL1799 et d'un autre clone ne portant pas la mutation (C->G) supplémentaire, un fragment NdeI-BamHI de 1097 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a (AMS Biotechnology), lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Deux vecteurs recombinants ont ainsi été obtenus : Le vecteur pXL1775, qui permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 13 acides aminés N-terminaux ($\Delta N13$) et une glycine au lieu d'une arginine en position 93 (R93G); et le vecteur pXL1869, qui permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 13 acides aminés N-terminaux ($\Delta N13$).

2. Génération du vecteur pXL1766 et préparation du polypeptide P($\Delta C44$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CTGAGGGACAAGGTCAACTGAGGATCCAGCACCTTCAAGGAGAAAG-3',
une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site BamHI ainsi qu'un codon TGA dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 1000 et 997, provoquant une délétion des 44 acides aminés C-terminaux.

A partir d'un clone mutant (pXL1765) dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1004 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1766 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 44 acides aminés C-terminaux ($\Delta C44$).

3. Génération du vecteur pXL1774 et préparation du polypeptide P($\Delta C194$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CTCAAGGGACGCCCTTACGTGAGGATCCGACGAATTCCAAAGTC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site BamHI ainsi qu'un codon TGA dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 553 et 550, provoquant une délétion de 194 acides aminés du côté C-terminal.

A partir d'un clone mutant (pXL1798) dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 555 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1774 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 194 derniers acides aminés ($\Delta C194$).

4. Génération du vecteur pXL1817 et préparation du polypeptide P(Δ N182).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GAGCTCAAGGGACGCCATATGCCCTACGCTGACGAATTC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un site NdeI ainsi qu'un codon ATG dans la séquence codante de l'apoAIV aux positions respectives 544 et 547, provoquant une délétion de 182 acides aminés du côté N-terminal.

A partir d'un clone mutant (pXL1765) dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 579 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1817 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des 182 premiers acides aminés (Δ N182).

5. Génération du vecteur pXL1981 et préparation du polypeptide P(Δ h1-2).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GCCACAGTGATGTGGCCCTTTGCCACCGAG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 40 et 186, provoquant une délétion de 49 acides aminés, du résidu D14 au résidu V62.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 990 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1981 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 1 et 2 (Δ h1-2).

6. Génération du vecteur pXL1943 et préparation du polypeptide P(Δ h7-8).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-CAGGCCTCGCTGAGGCCCTATGCTCAGGAC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis

de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 484 et 615 provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P162 au résidu A205.

5 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1005 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui-même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1943 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 7 et 8 ($\Delta h7-8$).

7. Génération du vecteur pXL1982 et préparation du polypeptide P($\Delta h9-10$).

10 A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CGCCGCAGCCTGGCTCCCTTGGCCGAGGAC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions
15 616 et 747, provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P206 au résidu A249.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1005 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui-même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

20 Le vecteur recombinant pXL1982 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 9 et 10 ($\Delta h9-10$).

8. Génération du vecteur pXL1986 et préparation du polypeptide P($\Delta h11-12, L87M$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CGGCAGAGGCTGGCGCCCTACGGGGAAAAC-3', une mutagénèse dirigée
25 sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 748 et 867, provoquant une délétion de 40 acides aminés, du résidu P250 au résidu E289. Par ailleurs, lors de la vérification de séquence des dérivés obtenus,
30 certains clones portaient une mutation ponctuelle supplémentaire sur la séquence. Cette mutation (L->M) a pour effet de changer le codon leucine 87 en méthionine dans la protéine.

A partir de ce clone et d'un autre clone ne portant pas la mutation (L->M) supplémentaire, un fragment NdeI-BamHI de 1017 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Deux vecteurs recombinants ont ainsi été obtenus, dont le vecteur pXL1986 qui permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 11 et 12 ($\Delta h11-12$) et une méthionine au lieu d'une leucine en position 87 (L87M).

9. Génération du vecteur pXL1987 et préparation du polypeptide P($\Delta h13-14$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CGACGCCGGGTGGAGTCCTTCTTCAGCACC-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1872 décrit ci-dessus a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 868 et 999, provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P290 au résidu N333.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-BamHI de 1005 pb a été purifié et ligaturé avec le vecteur pET3-a, lui même coupé par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL1987 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 13 et 14 ($\Delta h13-14$).

B2 : Mutants réalisés à partir du plasmide pXL1696

1. Génération du vecteur pXL2071 et préparation du polypeptide P($\Delta h5-6$).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-CAGCAGCGCCTGGAGCCCCACGCCGACGAG-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis de déléter la partie de la séquence codante de l'apoAIV comprise entre les positions 352 et 483, provoquant une délétion de 44 acides aminés, du résidu P118 au résidu R161.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 432 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-

BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2071 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une délétion des hélices 5 et 6 ($\Delta h5-6$).

5 2. Génération du vecteur pXL2063 et préparation du polypeptide P(D5S).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GAGGTCAGTGCTAGCCAGGTGGCCACA-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis
10 d'introduire un codon AGC dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une sérine en position 5.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes
15 NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2073 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une sérine en position 5.

3. Génération du vecteur pXL2069 et préparation du polypeptide P(D5K).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

20 5'-GAGGTCAGTGCTAAACAGGTGGCCACA-3', une mutagénèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagénèse a permis d'introduire un codon AAA dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une lysine en position 5.

25 A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

30 Le vecteur recombinant pXL2069 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une lysine en position 5.

4. Génération du vecteur pXL2062 et préparation du polypeptide P(D44F).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GCCCTCTTCCAGTTCAAACTTGGAGAA-3', une mutagenèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagenèse a permis d'introduire un codon TTC dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une phénylalanine en position 44.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2062 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une phénylalanine en position 44.

5. Génération du vecteur pXL2074 et préparation du polypeptide P(D44A).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GCCCTCTTCCAGGCGAAACTTGGAGAA-3', une mutagenèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL1696 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagenèse a permis d'introduire un codon GCG dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide aspartique par une alanine en position 44.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment NdeI-EcoRI de 564 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment EcoRI-BamHI isolé du plasmide pXL2051 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2074 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une alanine en position 44.

B3 : Mutants réalisés à partir du plasmide pXL2051

1. Génération du vecteur pXL2073 et préparation du polypeptide P(K178A).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :

5'-GTGGAGGAGCTCGCGGGACGCCTTACG-3', une mutagenèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL2051 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagenèse a permis d'introduire un codon GCG dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le
5 remplacement de la lysine par une alanine en position 178.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment EcoRI-BamHI de 572 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment NdeI-EcoRI isolé du plasmide pXL1696 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

10 Le vecteur recombinant pXL2073 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une alanine en position 178.

2. Génération du vecteur pXL2070 et préparation du polypeptide P(K178Y).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-GTGGAGGAGCTCTTATGGACGCCTTACG-3', une mutagenèse dirigée sur la
15 forme simple brin du plasmide pXL2051 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagenèse a permis d'introduire un codon TAT dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de la lysine par une tyrosine en position 178.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un
20 fragment EcoRI-BamHI de 572 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment NdeI-EcoRI isolé du plasmide pXL1696 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

Le vecteur recombinant pXL2070 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une tyrosine en position 178.

25 3. Génération du vecteur pXL2072 et préparation du polypeptide P(E230K).

A l'aide de l'oligodésoxynucléotide synthétique phosphorylé suivant :
5'-AAGAAGAACGCCAAAGAGCTCAAGGCCAG-3', une mutagenèse dirigée sur la forme simple brin du plasmide pXL2051 (Cf exemple A2) a été réalisée en utilisant le kit Amersham selon les recommandations du fabricant. Cette mutagenèse
30 a permis d'introduire un codon AAA dans la séquence codante de l'apoAIV, provoquant le remplacement de l'acide glutamique par une lysine en position 230.

A partir d'un clone mutant dont la séquence a été vérifiée intégralement, un fragment EcoRI-BamHI de 572 pb a été purifié, puis ligaturé avec le fragment NdeI-EcoRI isolé du plasmide pXL1696 et le vecteur pET3-a ouvert par les enzymes NdeI et BamHI.

- 5 Le vecteur recombinant pXL2072 ainsi obtenu permet d'exprimer à très haut niveau un polypeptide possédant une lysine en position 230.

B4 : Production des polypeptides décrits dans les parties B1-B3.

1. Production : On utilise par exemple la souche BL21 DE3 (pLysS) contenant un plasmide d'expression d'un polypeptide de l'invention tel que décrit dans les parties
10 B1-B3.

- Une préculture de nuit en milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/ml) et du chloramphénicol (50 µg/ml), LBApCm, à 37°C, sert à inoculer au 1/100ème la culture de production (même milieu). La culture est agitée à 37°C jusqu'à une densité optique (mesurée à 610 nm) de 0,5. On ajoute alors de l'IPTG à la concentration
15 finale de 1 mM et les cellules induites pour l'expression de l'ARN polymérase de T7 sont incubées pendant 90 ou 180 min. L'analyse des extraits bactériens par gel d'électrophorèse coloré au bleu de coomassie permet de révéler une accumulation dans les extraits des cultures de 90 min du polypeptide de l'invention. Par ailleurs, ce polypeptide peut être stabilisé par ajout de rifampicine durant la phase de production.
20 Les seuls ARNm pouvant alors être néosynthétisés sont ceux qui ne dépendent pas de l'ARN polymérase d'E.coli. On peut ajouter par exemple 20 min après l'ajout de l'IPTG de la rifampicine à des concentrations qui peuvent être comprises entre 50 et 200 µg/ml. Les cellules qui ne produisent alors plus que le seul ARNm du polypeptide désiré à l'exception de tous les autres sont incubées entre 90 et 180 min à
25 37°C.

Dans ce cas, le polypeptide recombinant produit peut représenter de 20 à 30 % des protéines totales produites par la bactérie. De plus le polypeptide est ainsi accumulé sans dégradation dans la bactérie sous forme soluble.

- La production a été extrapolée en fermenteur, par culture haute densité de
30 E.coli en mode Fed-Batch. Cette production a été réalisée dans un fermenteur de 2 litres (Setric) en 2 phases : une phase de croissance du microorganisme jusqu'à une DO600 de 30 à 40 (durée : 5 heures environ). Cette phase est réalisée dans le milieu de fermentation défini par Jung et al. (Ann.Inst.Pasteur/Microbiol. 139 (1988)

129-146) ; puis une phase d'induction de la production, par addition d'IPTG et de rifampicine, et augmentation du débit d'alimentation en substrats carboné et azoté (durée : 1 heure 30 minutes environ).

5 2. Lyse des cellules et récupération du polypeptide recombinant.

Après la culture de production, les cellules sont collectées puis lysées, par exemple par sonication. A l'échelle du laboratoire, il a été utilisé un sonicateur Branson (modèle B30, Proscience, France) après avoir concentré 30 fois les cellules dans le tampon PBS (KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, NaCl 8 g/l, Na₂HPO₄ 1,25 g/l).

10 Le cassage des cellules est effectué à 4°C en mode continu (2 impulsions de 5 minutes). On peut également prétraiter la suspension cellulaire concentrée en présence de Triton X-100 à la température ambiante avant la sonication.

C/ PURIFICATION DES POLYPEPTIDES DE L'INVENTION.

Les polypeptides P(R93G), P(Δ C44) et P(Δ N13) ont été purifiés selon le
15 protocole suivant, qui se déroule en conditions natives et ne requiert aucune étape d'affinité pour les lipides.

La culture cellulaire est centrifugée à 6.000 tr/min pendant 30 minutes et le culot est repris à raison de 3 ml par gramme de cellules humides dans le tampon A (Na₂HPO₄ 81 mM, NaH₂PO₄ 19 mM ; EDTA, 2 mM ; PMSF, 1 mM ; pH 7,5 ;
20 β -mercaptoéthanol 10 mM). La suspension est traitée par 8 cycles de 3 minutes d'ultrasons (modèle BRANSON réglé à 250W) à 4°C. Les extraits sont centrifugés pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Le surnageant S1 est conservé et le culot est lavé dans le même volume de tampon A et recentrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant correspondant S1' est ajouté au surnageant S1.

25 Après un dosage des protéines de la fraction (S1 + S1') est ajoutée une solution aqueuse de sulfate de streptomycine à 10 % à raison de 10 ml de solution par gramme de protéine. Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation douce, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Le surnageant (S2) est récupéré. A cette fraction S2 est ajouté du sulfate d'ammonium (concentration
30 finale : 25 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Au surnageant S25 est ajouté du sulfate d'ammonium (concentration finale : 50 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée

pendant 30 min à 15.000 tr/min à 4°C. Le culot (C50) est récupéré et repris dans le tampon B (Tris-HCl, 10 mM ; EDTA, 2 mM ; pH8.8) et dialysé contre 2 l de tampon B que l'on change 5 fois durant 48 heures.

Le dialysat est injecté sur une colonne échangeuse d'ions de type QFF (Pharmacia) et élué avec un gradient de NaCl. La détermination des fractions contenant les polypeptides de l'invention est effectuée selon un test en Elisa décrit ci-après. Les fractions intéressantes sont rassemblées et concentrées par précipitation en sulfate d'ammonium (concentration finale : 80 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 15.000 tr/min à 4°C. Le culot (C80) est récupéré et repris dans le tampon B et dialysé contre 2 l de tampon B.

Le dialysat est injecté sur une colonne échangeuse d'ions de type Mono Q (Pharmacia) et élué avec un gradient de NaCl. Les fractions intéressantes, identifiées par le test Elisa ci-après décrit et gel SDS 15 %, sont rassemblées et concentrées par précipitation en sulfate d'ammonium (concentration finale : 80 % de saturation). Après 15 minutes d'incubation à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée et reprise dans le tampon D (sulfate d'ammonium, 1,7 M ; Na_2HPO_4 8,1 mM, NaH_2PO_4 1,9 mM ; EDTA, 2 mM ; pH 7.4) et dialysée contre 2 l de tampon D.

Le dialysat est injecté sur une colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes Phényl-sépharose (Pharmacia) et élué avec le tampon E (Na_2HPO_4 8,1 mM ; NaH_2PO_4 1,9 mM ; EDTA, 2 mM ; pH 7.4). Les fractions intéressantes sont identifiées par test Elisa et gel de polyacrylamide SDS.

Brièvement, le test ELISA mis au point consiste à adsorber sur une plaque avec un sérum polyclonal de lapin dirigé contre l'apoAIV humaine (dilué à 1/1000ème), saturer cette plaque à la gélatine, incuber l'échantillon à tester et enfin, faire réagir un mélange équimolaire de deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'apoAIV (MO3 et MO5, SERLIA, Institut Pasteur de Lille), suivi d'une révélation immunoenzymatique à l'aide d'un sérum polyclonal anti-souris couplé à la peroxydase. Ce test est facilement étalonné avec une gamme de dilutions de l'apoAIV plasmatique.

Ces fractions sont rassemblées et dialysées contre le tampon F (sulfate d'ammonium, 40 % de saturation ; Na_2HPO_4 8,1 mM ; NaH_2PO_4 1,9 mM ; EDTA, 2 mM ; pH7.4) et conservées à 4°C.

Pour les polypeptides P(Δ h1-2) et P(Δ N182), la fraction S2 est directement injectée sur colonne de type QFF (sans précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium) équilibrée en tampon B. Le polypeptide est exclu (P(Δ N182)) ou élué

avec un palier à 250 mM NaCl en tampon B (P(Δ h1-2)). Le polypeptide est ensuite concentré par précipitation en sulfate d'ammonium (concentration finale 50 % de la saturation pour P(Δ h1-2), 10 % pour P(Δ N182)). La purification de P(Δ h1-2) est terminée par une centrifugation (30 min., 4°C, 10 000 g). Le culot est récupéré, repris
5 en tampon PBS, désalé sur colonne de gel-filtration PD10 (Pharmacia) et séché à -20°C. Le polypeptide P(Δ N182) précipité au sulfate d'ammonium est injecté sur une colonne de chromatographie d'interactions hydrophobes phényl-sépharose (Pharmacia) et élué avec le tampon B. Le polypeptide est identifié par gel de polyacrylamide SDS, et les fractions intéressantes sont rassemblées et dialysées contre le tampon B et
10 conservées à 4°C.

D/ CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES POLYPEPTIDES DE L'INVENTION.

L'activité biologique des polypeptides de l'invention a été évaluée principalement sur la base de 2 paramètres : leur affinité pour le récepteur HDL et
15 leur effet sur l'efflux du cholestérol. Ces 2 paramètres rendent compte du potentiel pharmacologique hypocholestérolémiant des polypeptides de l'invention. Le protocole de détermination de ces paramètres est donné ci-après ainsi que les résultats obtenus.

1. Protocoles de mesure.

20 a) Affinité pour le récepteur HDL

Les polypeptides purifiés sont utilisés dans un premier temps pour reconstituer des protéoliposomes avec du DMPC, dont la structure apparaît identique, au vu du comportement en chromatographie d'exclusion, à celle des protéoliposomes reconstitués avec de l'apoAIV native. Ces protéoliposomes
25 reconstitués sont ensuite testés pour leur capacité de se fixer à des adipocytes murins (lignée Ob177) selon un protocole déjà décrit.

b) Efflux du cholestérol

L'efflux du cholestérol à partir de cellules adipocytaires murines (lignée Ob177) provoqué par les protéoliposomes DMPC-polypeptides de l'invention est
30 déterminé après 5 heures d'incubation.

2. Résultats

	Polypeptide	Kd(%)	Bmax(%)	Efflux à 5h (%)*
	ApoAIV	100**	100**	28
	P(R93G)	115	97	27,5
5	P(Δ h1-2)	105	94	25,5
	P(Δ C44)	nd	nd	32
	P(Δ N13)	96	94	24

(*) Exprimé en % du cholestérol initial des cellules chargées, l'efflux de base obtenu en présence de DPMC seul après 5 heures est de 11%.

10 (**) Réalisé sur trois expériences indépendantes.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide dérivé de l'apolipoprotéine AIV humaine caractérisé en ce qu'il comprend, par rapport à la séquence de l'apolipoprotéine AIV humaine telle que représentée sur la figure 1, au moins une des modifications suivantes :
 - 5 (a) une mutation ponctuelle portant sur un résidu fonctionnel, et/ou,
 - (b) une délétion d'une extrémité terminale d'au moins 10 acides aminés, et/ou,
 - (c) une délétion d'une hélice ou d'une paire d'hélices, et/ou,
 - (d) une partie additionnelle hétérologue possédant une activité biologique différente ou complémentaire de celle de l'apoAIV, ou une propriété de marqueur, de cibleur
 - 10 ou de stabilisateur.
2. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une modification selon (a) et (b).
3. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une modification selon (a) et (c).
- 15 4. Polypeptide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend une modification selon (a), (b) ou (c) associée à une modification selon (d).
5. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le résidu fonctionnel est choisi parmi les résidus chargés, les résidus sites de glycosylation et les résidus impliqués dans des ponts disulfure.
- 20 6. Polypeptide selon la revendication 5 caractérisé en ce que le résidu fonctionnel est choisi parmi les résidus suivants : acide aspartique en position 5, 44, 106, 153 ; glutamine en position 37, 194 ; asparagine en position 39 ; lysine en position 73, 84, 103, 169, 178 ; acide glutamique en position 76, 81, 87, 99, 131, 164, 187, 230 ; alanine en position 22 ; proline en position 139, 161 ; et serine en
- 25 position 154.
7. Polypeptide selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides suivants décrits dans les exemples : P(Δ N13,R93G), P(Δ N13), P(R93G), P(Δ C44), P(Δ C194), P(Δ N182), P(Δ h1-2), P(Δ h7-8), P(Δ h9-10), P(Δ h11-12), P(Δ h11-12,L87M), P(Δ h13-14), P(Δ h5-6), P(D44F), P(D44A),
- 30 P(D5S), P(D5K), P(K178Y), P(K178A), et P(E230K).

8. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Séquence nucléotidique selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADNc, d'ADNg, d'ARN ou d'une séquence synthétique ou
5 semi-synthétique.

10. Séquence nucléotidique selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADNc.

11. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 8 à 10.

10 12. Cellule recombinante contenant un vecteur selon la revendication 11.

13. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule recombinante selon la revendication 12 et on récupère le polypeptide produit.

15 14. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation de molécules non peptidiques ou non exclusivement peptidiques actives pharmacologiquement sur les niveaux plasmatiques de cholestérol, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité, et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

20 15. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs polypeptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, ou une ou plusieurs séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 8 à 10, ou une ou plusieurs molécules préparées selon la revendication 14.

25 16. Composition selon la revendication 15 destinée au traitement ou à la prévention des affections liées aux hypercholestérolémies.

17. Composition selon la revendication 16 destinée au ralentissement de la formation de plaques d'athérome, et/ou à la régression des plaques d'athérome et/ou à la diminution des risques d'accidents coronariens.

Pl. I/5

1/1 31/11
 ATG GAG GTC AGT GCT GAC CAG GTG GCC ACA GTG ATG TGG [GAC TAC TTC AGC CAG CTG AGC
 Met glt val ser ala asp glt val ala thr val met trp [asp tyr phe ser glt leu ser
 61/21 91/31
 AAC AAT GCC AAG GAG GCC GTG GAA CAT CTC CAG AAA TCT GAA CTC ACC CAG CAA CTC AAT
 asn asn ala lys glt ala val glt his leu glt lys ser glt leu thr glt glt leu asn
 121/41 151/51
 [GCC CTC TTC CAG GAC AAA CTT GGA GAA GTG AAC ACT TAC GCA GGT GAC CTG CAG AAG AAG
 ala leu phe glt asp lys leu glt glt val asn thr tyr ala glt asp leu glt lys lys
 181/61 211/71
 CTG GTG [CCC TTT GCC ACC GAG CTG CAT GAA CGC CTG GCC AAG GAC TCG GAG AAA CTG AAG
 leu val [pro phe ala thr glt leu his glt arg leu ala lys asp ser glt lys leu lys
 241/81 271/91
 GAG GAG ATT GGG AAG GAG CTG GAG GAG CTG AGG GCC CGG CTG CTG [CCC CAT GCC AAT GAG
 glt glt ile glt lys glt leu glt glt leu arg ala arg leu leu [pro his ala asn glt
 301/101 331/111
 GTG AGC CAG AAG ATC GGG GAC AAC CTG CGA GAG CTT CAG CAG CGC CTG GAG [CCC TAC GCG
 val ser glt lys ile glt asp asn leu arg glt leu glt glt arg leu glt [pro tyr ala
 361/121 391/131
 GAC CAG CTG CGC ACC CAG GTC AAC ACG CAG GCC GAG CAG CTG CGG CGC CAG CTG ACC [CCC
 asp glt leu arg thr glt val asn thr glt ala glt glt leu arg arg glt leu thr [pro
 421/141 451/151
 TAC GCA CAG CGC ATG GAG AGA GTG CTG CGG GAG AAC GCC GAC AGC CTG CAG GCC TCG CTG
 tyr ala glt arg met glt arg val leu arg glt asn ala asp ser leu glt ala ser leu
 481/161 511/171
 AGG [CCC CAC GCC GAC GAG CTC AAG GCC AAG ATC GAC CAG AAC GTG GAG GAG CTC AAG GGA
 arg [pro his ala asp glt leu lys ala lys ile asp glt asn val glt glt leu lys glt
 541/181 571/191
 CGC CTT ACG [CCC TAC GCT GAC GAA TTC AAA GTC AAG ATT GAC CAG ACC GTG GAG GAG CTG
 arg leu thr [pro tyr ala asp glt phe lys val lys ile asp glt thr val glt glt leu
 601/201 631/211
 CGC CGC AGC CTG GCT [CCC TAT GCT CAG GAC ACG CAG GAG AAG CTC AAC CAC CAG CTT GAG
 arg arg ser leu ala [pro tyr ala glt asp thr glt glt lys leu asn his glt leu glt
 661/221 691/231
 GGC CTG ACC TTC CAG ATG AAG [AAG AAC GCC GAG GAG CTC AAG GCC AGG ATC TCG GCC AGT
 glt leu thr phe glt met lys [lys asn ala glt glt leu lys ala arg ile ser ala ser
 721/241 751/251
 GCC GAG GAG CTG CGG CAG AGG CTG GCG [CCC TTG GCC GAG GAC GTG CGT GGC AAC CTG AGG
 ala glt glt leu arg glt arg leu ala [pro leu ala glt asp val arg glt asn leu arg
 781/261 811/271
 GGC AAC ACC GAG GGG CTG CAG [AAG TCA CTG GCA GAG CTG GGT GGG CAC CTG GAC CAG CAG
 glt asn thr glt glt leu glt [lys ser leu ala glt leu glt glt his leu asp glt glt
 841/281 871/291
 GTG GAG GAG TTC CGA CGC CGG GTG GAG [CCC TAC GGG GAA AAC TTC AAC AAA GCC CTG GTG
 val glt glt phe arg arg arg val glt [pro tyr glt glt asn phe asn lys ala leu val
 901/301 931/311
 CAG CAG ATG GAA CAG CTC AGG CAG AAA CTG GGC [CCC CAT GCG GGG GAC GTG GAA GGC CAC
 glt glt met glt glt leu arg glt lys leu glt [pro his ala glt asp val glt glt his
 961/321 991/331
 TTG AGC TTC CTG GAG AAG GAC CTG AGG GAC AAG GTC AAC [TCC TTC TTC AGC ACC TTC AAG
 leu ser phe leu glt lys asp leu arg asp lys val asn [ser phe phe ser thr phe lys
 1021/341 1051/351
 GAG AAA GAG AGC CAG GAC AAG ACT CTC TCC CTC CCT GAG CTG GAG CAA CAG CAG GAA CAG
 glt lys glt ser glt asp lys thr leu ser leu pro glt leu glt glt glt glt glt
 1081/361 1111/371
 CAG CAG GAG CAG CAG CAG GAG CAG GTG CAG ATG CTG GCC CCT TTG GAG AGC TGA
 glt glt glt glt glt glt glt val glt met leu ala pro leu glt ser OPA

Figure 1

Pl. II/5

Oligo A:

5'-CTAGACATATGGAGGTCAGTGCTGACCAGGTGGCCACAGTGATGTGGGACTACTTCAGCCAGCTGAGCAACA
ATGCCAAGGAGG-3'

Oligo B:

5'-CCGTGGACATCTCCAGAAATCTGAACTCAGCCAGCACTCAATGCCCTCTTCAGGACAACTTGGAGAA
GTGAACACTTACGCAGGTGACCG-3'

Oligo C:

5'-CCACGGCCTCCTTGGCATTGTTGCTCAGCTGGCTGAAGTAGTCCACATCACTGTGGCCACCTGGTCAGCAC
TGACCTCCATATGT-3'

Oligo D:

5'-AATTCGGTCACCTGCGTAAGTGTTCACTTCTCCAAGTTTGTCTGGAGAGGGCATTGAGTTGCTGGGTGAG
TTCAGATTTCTGGAGATGTT-3'

FIGURE 2

Pl. III/5

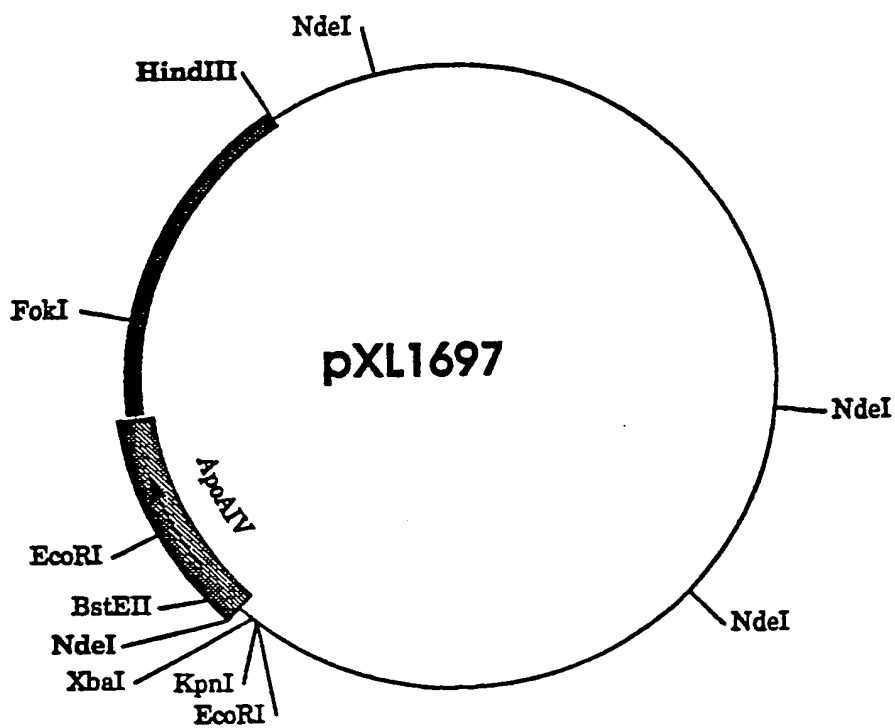
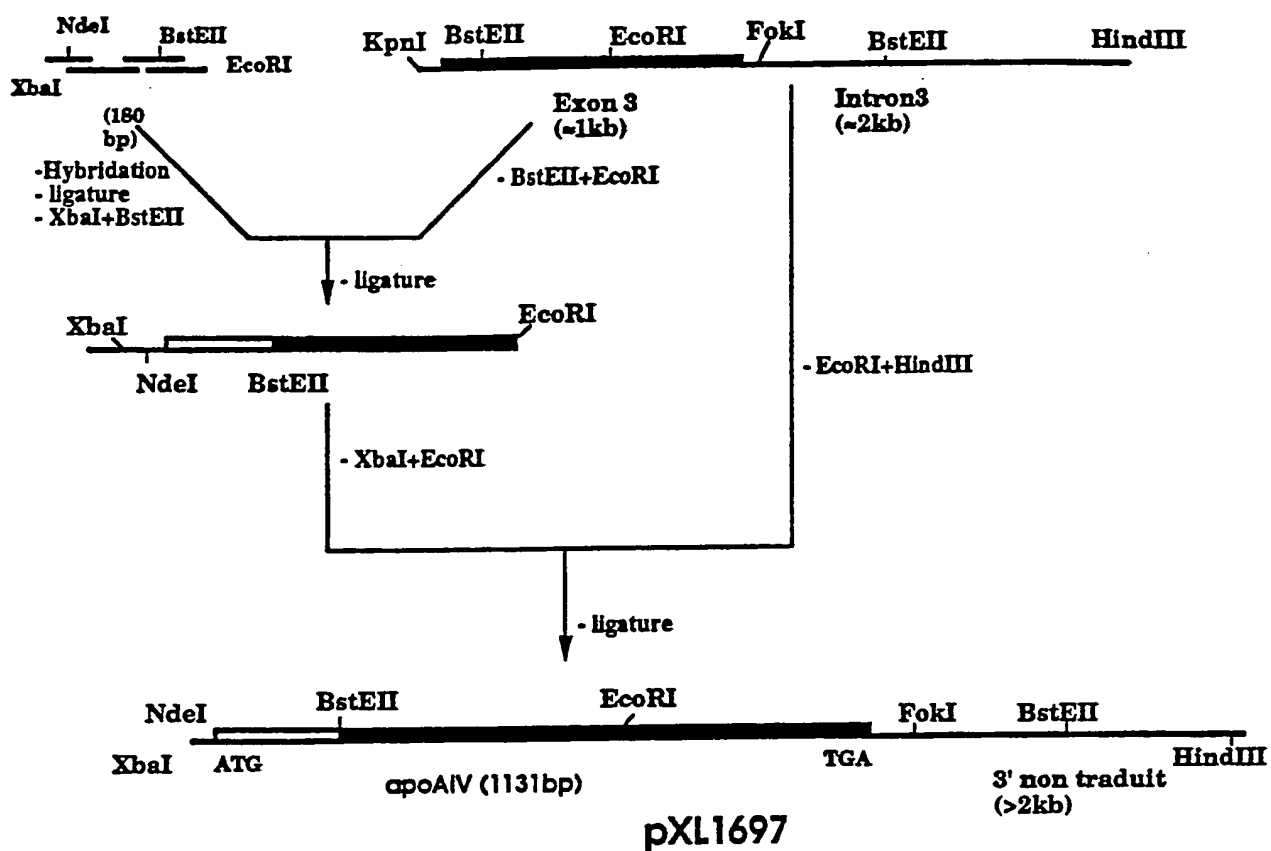


FIGURE 3

Pl. IV/5

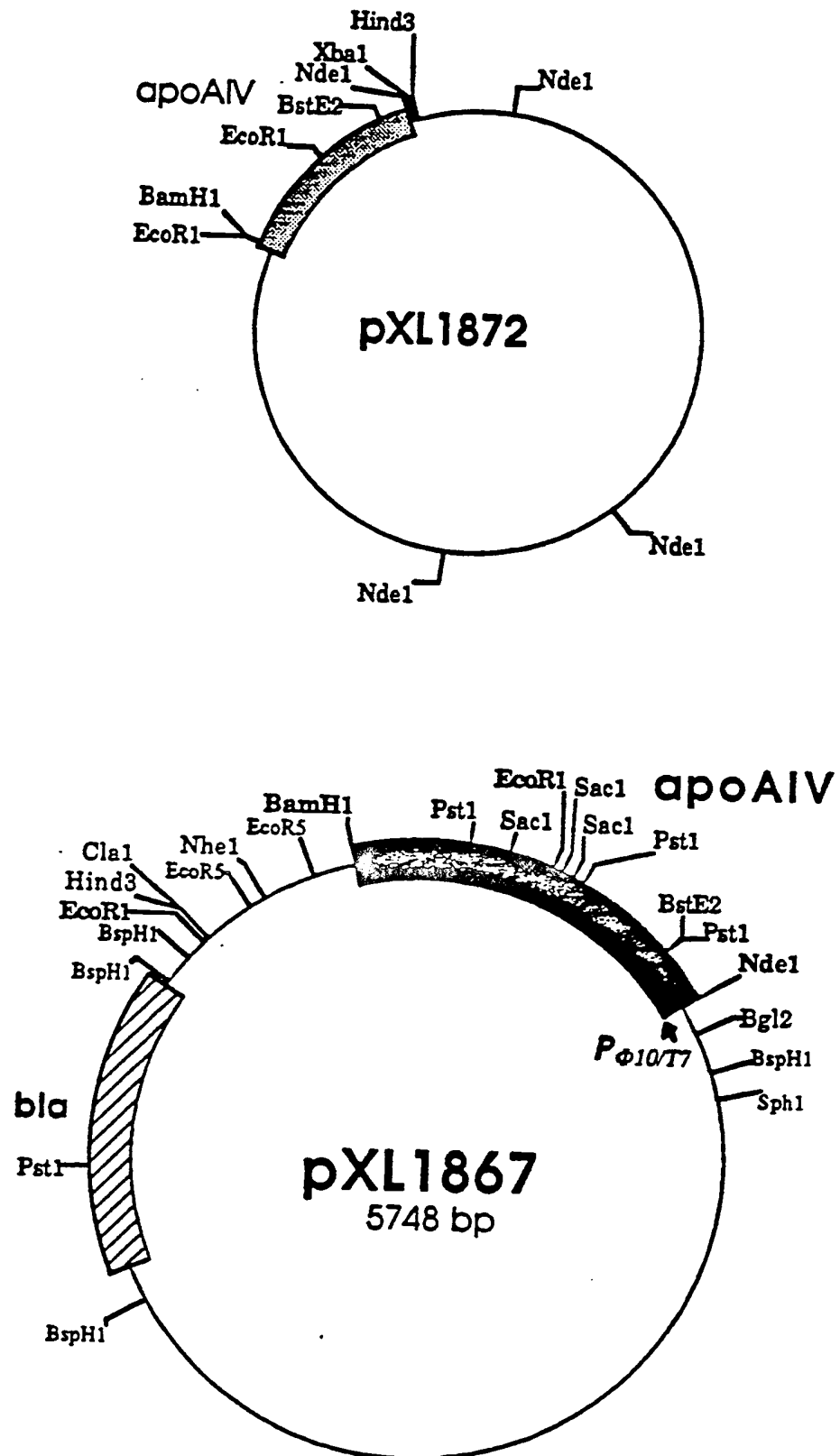


Figure 4

Pl. V/5

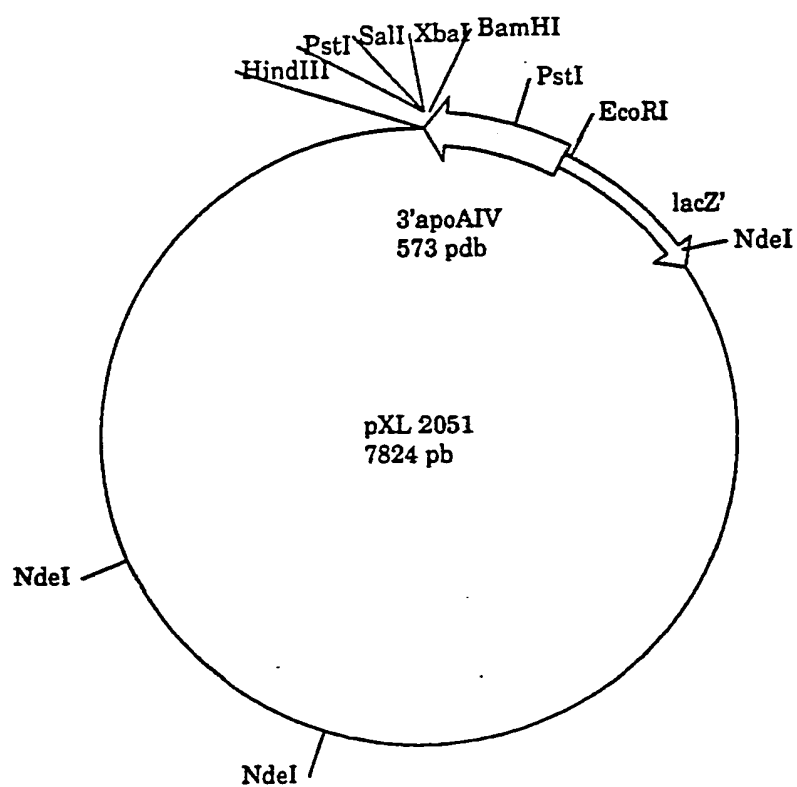
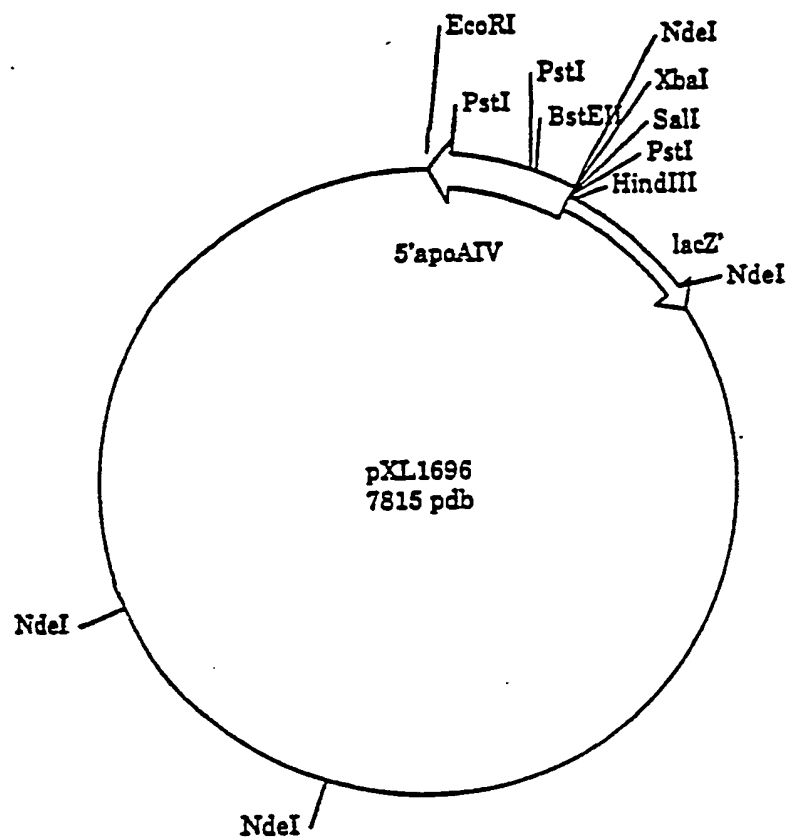


Figure 5

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9200806
FA 467878

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 262, no. 17, 15 Juin 1987, BALTIMORE US pages 7973 - 7981; N, ELSHOUBAGY ET AL: 'Structure and expression of the human apolipoprotein A-IV gene' * le document en entier *	1, 3-5, 7-13, 15-17
Y	WO-A-9 012 879 (C. SIRTORI) 1 Novembre 1990 * page 4, ligne 10 - ligne 27 *	1, 3-5, 7-13, 15-17
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07K
Date d'achèvement de la recherche 26 AOUT 1992		Examinateur VAN DER SCHAAL C.A.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

